

***Lawsonia intracellularis*; Utvärdering av provtagning med tops**

*Utvärdering av provtagningsteknik med tops vid diagnostik av Lawsonia
intracellularis hos tillväxtgrisar*

Susanne Wennerbo

**Handledare: Magdalena Jacobson
Inst. för kliniska vetenskaper
Sektionen för svin- och fjäderfä sjukdomar**

**Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

**Examensarbete 2005:58
ISSN 1652-8697
Uppsala 2005**

Innehållsförteckning:

Ordlista	4
Abstract	6
Sammanfattning	6
Inledning	7
Historik	7
Bakterien	7
Klinik	8
Patologi	8
Histologi	9
Diagnostik	9
Polymerase Chain Reaction (PCR)	10
Inhibition	12
Mimic	12
Åtgärder, behandling	13
Material och metoder	14
Besättningar	14
Djur	14
Provtagning	14
Hantering av proverna	15
Preparering av faecesprover och tops med koklys	15
Preparering av faeces med QIAamp®DNA Stool Mini Kit	16
Enkel PCR	16
Nested PCR	17
Elektrofores, infärgning av gel och avläsning av resultat	17
Resultat	18
Besättningar	18
Prepareringarna	20
Djur	21
Inhibition	22
Diskussion	24
Besättningar	25
Djur	25
Prepareringar	26
Provtagningstekniker	26
Mimic	27
Slutsatser	27
Tack	27

Ordlista

Annealing: Ögonblicket i PCR-processen då primrarna fäster in på rätt ställe på DNA-strängen.

Baspar: De två kompletterande nukleotider som tillsammans utgör byggstenarna i den dubbla DNA-strängens uppbyggnad. Basparen är alltid A-T eller C-G.

Borstbräm: Tarmcellernas cellvägg ut mot tarmlumen (hålrummet) som består av mikrovillistrukturer (cytoplasmatiska utskott i riklig mängd).

Denaturering: De dubbla DNAsträngarna värms upp så pass att de separerar till enkelsträngat DNA.

DNA: Deoxyribonukleinsyra, de molekyler som det genetiska materialet i cellerna är uppbyggt av.

Elongering: Enzymet (Polymeras) bygger med utgångspunkt från de infästa primrarna upp en ny DNA-sekvens med den befintliga DNAsträngen som mall.

Faeces: avföring

GLS: (Gel Loading Solution) Färg plus glycerin som blandas med den färdiga PCR-produkten innan elektrofores, så att man kan se när provet har vandrat tillräckligt långt i agarosgelen. Glycerin är tungt vilket gör att proverna lägger sig i botten av gelens brunnar.

In vivo: Latin som betyder "i livet", d v s i det levande djuret.

In vitro: Latin som betyder "i glaset", d v s under laboratoriska förhållanden, ej i den levande kroppen.

Lamda (λ)-stege: En lösning innehållande konstgjort DNA i flera kända varierande storlekar, så att en jämförelse mellan lamda-stegen och proverna (i agarosgelen) kan bestämma storleken på DNA-fragmenten i proverna.

Lysering: Cellväggar i celler och bakterier bryts isär.

Mastermix: Den totala mängden lösning i vilken PCR-processen ska äga rum. I mastermixen ingår bland annat nukleotider, primrar och reaktionsenzym. Mastermixen fördelas sedan i lika mängd till varje PCR-rör (i detta fall 23-24 μ l per rör) innan templatet tillsätts.

Nedströms: (om DNA och primer) Byggstenarna i enkelsträngat DNA är sammanfogade på så vis att en uppbyggnad alltid sker i en viss riktning. I den dubbelsträngade DNA-molekylen går de båda strängarnas riktning tvärs emot varandra. DNA-fragmentet som ska anrikas byggs därför upp medströms med utgångspunkt från en primer uppströms om det utvalda DNAfragmentet på "rätt" sträng, och motströms (bak och fram" med utgångspunkt från den andra primern nedströms om det utvalda DNAfragmentet på den komplementära strängen (efter det att de båda strängarna har separerat från varandra och primrarna har fäst in).

Nukleotider: De fyra byggstenar som bygger upp en enkel DNA-sträng. De består förutom av deoxyribos (ett socker), och fosfat, av baserna adenin (A), tymidin (T), cytosin (C), och guanin (G).

PCR: Polymerase chain reaktion, en anrikningsprocess av ett utvalt DNAfragment med hjälp av ett värmetåligt enzym.

Pellet: Den fasta fas bestående av tyngre partiklar som bildas längst ner i centrifugeringsröret efter centrifugering av en lösning/suspension.

Pleomorf: Förekomma i olika former.

Prevalens: Andelen sjuka (i en specifik sjukdom) i en viss population vid en viss tidpunkt.

Sekvensering: Att ta reda på DNAs uppbyggnad baspar för baspar. Tillvägagångssättet är mycket förenklat att en mindre mängd defekta och märkta nukleotider finns med i en i övrigt normal mastermix, vilket gör att uppbyggnaden av DNA under PCR-process stannar vid en sådan nukleotid. Detta gör att DNA-fragment av olika längd bildas, och vandrar olika långt i gelen under elektrofores. Eftersom de defekta nukleotiderna är märkta kan man avläsa vilken sorts nukleotid varje DNA-fragment av olika längd innehåller.

Sensitivitet: proportionen korrekt identifierade positiva prov.

Specificitet: proportionen korrekt identifierade negativa prov.

Supernatant: Vätskefasen som finns ovanför pelleterat material i centrifugeringsröret efter centrifugering av en lösning/suspension.

Suspension: Vätska innehållande uppslammade partiklar.

Templat: Det DNA-material som är mall för uppbyggandet av PCR-processat DNA. I det här arbetet utgörs det av 1µl av det preparerade provet.

Tillväxtgris: avvanda smågrisar (äldre än fyra veckor) som fortfarande inte förmedlats till slaktsvinsuppfödning, vilket sker vid ungefär 25-30 kg.

Uppströms: Se nedströms.

Vortex: Skaka, vibrera.

Värdspecificitet: De djurarter som bakterien kan kolonisera. Bred värdspecificitet; många arter kan drabbas, smal värdspecificitet; endast en / ett fåtal arter drabbas.

Utvärdering av provtagningsteknik med tops vid diagnostik av *Lawsonia intracellularis* hos tillväxtgrisar.

Abstract

Lawsonia intracellularis is an important pathogen in the intestine, causing diarrhea and retarded (or poor) growth in pigs.

Diagnostics is based on sampling of small amounts of faeces. Several published scientific papers mention the use of faecal swabs as sampling material for diagnosis in experiments and in prevalence studies. Therefore the need of an evaluation of this sampling technique is urgent since, to our knowledge, this has not previously been done. Here reported work compare the use of rectal swabs for faecal sampling, with sampling and analysis of 0.1-0.2 gram of faeces.

The studie included twelve herds with a case history of earlier or ongoing problems with diarrhoea where *Lawsonia intracellularis* could be suspected as the causative agent. A total of 120 growing pigs where examined. This work aims to more precisely define the sensibility of these sampling methods.

Material collected with rectal swabs and prepared by boiling lysate where compared with faeces prepared by boiling lysate or a commercial sampling preparation method (QIAgen). The results of the PCR analysis show that swabs is less suitable for the use in diagnosis in individuals, or prevalence studies with sampling from animals without symptoms. If the swab is used at the right time, and on several animals in the same outbreak, with the clinic suspicion of *Lawsonia intracellularis*, the sampling technique can be used with greater accuracy to diagnose the bacteria.

Sammanfattning

Lawsonia intracellularis är en viktig tarmpatogen som orsakar diarréer och tillväxstörningar hos gris.

Nuvarande diagnostik är baserad på insamlandet av en liten mängd faeces. En hel del publicerade forskningsrapporter nämner att tops har använts som analysmaterial vid diagnos i forskningsförsök och prevalensstudier. Detta aktualiserar behovet av en utvärdering av provtagningstekniken, eftersom såvitt vi vet, ingen sådan undersökning har gjorts tidigare. Här redovisat arbete har jämfört provtagning av faeces med hjälp av tops gentemot den nuvarande provtagningen, där 0,1-0,2 gram faeces utgör provmaterialet. Försöket omfattade tolv gårdar med tidigare och/eller nuvarande diarréproblem och med misstanke om infektion med *Lawsonia intracellularis*. Sammanlagt provtogs 120 tillväxtgrisar. Arbetet syftar till att närmare bestämma provtagningsteknikens känslighet.

Prover tagna med tops och preparerade med koklysat jämfördes med faecesprover preparerade med koklysat eller ett kommersiellt kit, QIAgen. De preparerade proverna analyserades därefter med PCR. Resultaten visar att tops är mindre lämpliga för individuell diagnostik på enstaka djur, eller vid prevalensstudier med provtagning av symtomlösa individer. Används provtagningsmetoden vid rätt tidpunkt, d v s på ett flertal insjuknande djur med den kliniska misstanken *Lawsonia intracellularis*, kan provtagningsmetoden med större säkerhet användas för att diagnosticera bakterien.

Inledning

Bakterien *Lawsonia intracellularis* orsakar enteriter hos ett flertal djurslag, men är vanligast och mest undersökt hos gris. Sjukdomen går under benämningen porcin proliferativ enterit (PPE). De skador som den intracellulära tarmpatogenen orsakar resulterar i diarréer och tillväxtstörningar hos unga grisar (10). Sjukdomen orsakar stora ekonomiska förluster för svinnäringen (3, 8) och ett avsevärt lidande för djuren. En förutsättning för att kunna utföra adekvata åtgärdsprogram är en väl fungerande diagnostik, och för närvarande pågår på SLU ett projekt för att utveckla och utvärdera en enkel och känslig rutindiagnostik. I det här arbetet utvärderas provtagning med tops, och jämförs med de metoder som för närvarande används vid rutindiagnostik.

Eftersom *Lawsonia intracellularis* är mycket svårödlad och endast kan odlas i speciella cellkulturer (10) baseras nuvarande diagnostik på insamlandet av en sockerbits-stor mängd faeces som analyseras med PCR. En enklare provtagningsmetod vore provtagning med tops vilken även kan användas för påvisande av odlingsbara tarmpatogener.

I många försök med experimentellt utförda smittoöverföringar, och i artiklar om prevalensen av sjukdomen, nämns att provtagning skett med tops (5, 12, 14, 20, 24), men såvitt vi vet finns inga resultat publicerade som redovisar känslighet eller säkerhet hos denna metod. Det är därför viktigt att genomföra en utvärdering av provtagningsmetoden.

Historik

Redan 1931 beskrevs en proliferativ enterit som var experimentellt överförbar till andra grisar. Detta experiment upprepades sedan inte förrän på 70-talet, då forskningen runt sjukdomen tog ny fart (17). Små böjda stavformade bakterier kunde ses intracellulärt i de förändrade kryptcellerna i tarmen. Till att börja med trodde man att sjukdomen orsakades av *Campylobacter*, eftersom olika arter av dessa ofta kunde isoleras från skadorna. De intracellulära mikroorganismer som kunde iakttas var dessutom morfologiskt lika *Campylobacter* (17). Experiment utfördes därför där man utan framgång försökte återinfektera grisar med olika *Campylobacter* som odlats fram från sjuka grisar. Detta ledde till att många nya sorters *Campylobacter* upptäcktes och klassificerades. När experimentella infektioner med dessa *Campylobacter* inte resulterade i PPE stärktes misstankarna om att den intracellulära mikroorganismen var skild från tidigare kända arter av *Campylobacter*, och den kom att kallas "*Campylobacter-like organism*" (CLO) eller "*intracellular organism*" (IO) (17).

Senare (1993) kom den att få namnet *Ileal symbiont intracellularis* (16), då dess 16S rDNA sekvenserats och man konstaterat att den närmast var besläktad med den sulfatreducerande proteobakterien *Desulfovibrio desulfuricans* som hade till 91% överensstämmande 16S rDNA (6). Organismen döptes 1995 om till *Lawsonia intracellularis*. Flera skillnader hade då upptäckts mellan den intracellulära bakterien och *Desulfovibrio*-familjen. En närmare släkting, humanpatogenen *Bilophila wadsworthia* hade hittats (16S rDNA-överensstämmelse till 92 %). Denna anaeroba tarmbakterie hittas i avföringen hos 50 % av friska människor, men har även isolerats i skrotumabscesser, pleuravätska, ledvätska och blod, samt gangränösa blindtarmsinflammationer (4, 23).

Efter sekvensering av 16S rDNA, har bakterien placerats i fylum Proteobacteria, klass Delta, ordning Desulfovibrionales, Familj Desulfovibrionaceae, med eget genus (17, 18).

Bakterien

Den intracellulära mikroorganismen har som tidigare nämnts hittats hos ett stort antal djurslag som till exempel hamster (6, 17), råtta (17), iller (6), räv (6), kanin (17), hjort (17), struts (17), emu (17), häst (17) och makaker (13). En jämförelse mellan intracellulära

organismer hittade i anslutning till PPE-liknande tarmförändringar hos hamster, iller, kanin, hjort, struts och häst visade en 16S rDNA-släktskap på över 98 % (17). Hittills har ingen smitta rapporterats på människa (13).

Infekterade celler mognar inte på normalt sätt och delar sig ofta, vilket får till följd att en smittad tarmcell snabbt resulterar i flera smittade celler utan att någon extracellulär passage av bakterien behöver ske. Den snabba delningshastigheten ger en snabb tillväxt av omogna kryptceller, vilket är orsaken till de makroskopiska och mikroskopiska förändringar som uppträder i tarmen (17).

Den kända smittvägen är fekal-oral (3) men eftersom utbrott beskrivits hos SPF-besättningar (2, 5), kan även okända smittvägar finnas kvar att upptäcka.

De intracellulära mikroorganismerna återfinns fritt i tarmepitelets apikala cytoplasma, där de är jämnt fördelade under borstbrämen. Bakterien delar sig fritt i cytoplasman. Den är en gramnegativ, microaerofil, pleomorf stav, varierande böjd, med avsmalnande ändar. Den är ungefär 1,5 µm lång och 0,35 µm bred, och syrafast vid färgning med Ziehl-Nielsen (17).

Klinik

Bakterien är spridd i grisbesättningar över hela världen. I en studie gjord i Tyskland, Nederländerna och Belgien visade sig drygt 50% av besättningarna ha antikroppar mot *Lawsonia intracellularis* (21). I Sverige hårbärgerar ungefär 48 % av Sveriges svinbesättningar bakterien, beräknat på individer som utsöndrar bakterien i avföringen (9).

I en nyinfekterad besättning beräknas ungefär 12-50 % av djuren insjukna i den akuta formen (PHE, se nedan)(22). I redan nedsmittade besättningar är frekvensen ungefär den samma, 30% (9), men sjukdomsförloppet är av en mildare och mer kronisk karaktär (PIA, se nedan) (22).

Grisarna verkar vara mest känsliga för infektion mellan sex och 20 veckors ålder. Yngre grisar brukar drabbas mildare än de äldre. I de besättningar där mikroorganismen är etablerad förekommer oftast en mer kronisk symtombild med sämre tillväxt, fler ”pellar”, och mindre allvarliga diarréutbrott. Enstaka individer utvecklar kraftigare symtom, och dödligheten kan vara lite förhöjd (26).

Kommer bakterien in i en tidigare fri besättning blir sjukdomsförloppet mycket mer dramatiskt, med allvarliga, ofta blodiga diarréer och med en märkbart förhöjd dödlighet. Vartefter immunförsvaret mot bakterien stärks i besättningen blir utbrotten mildare, och övergår i en kronisk form (26).

I en besättning med *Lawsonia intracellularis*-relaterade problem börjar sjukdomsförloppet ofta hos de kultingar som har vants av och ses som en minskad foderkonsumtion, följt av diarré i varierande grad (26).

Patologi

PPE brukar delas in i fyra olika former baserat på tarmens utseende vid obduktion:

Porcin intestinal adenomatos (PIA), som karaktäriseras av en kronisk okomplicerad proliferation av slemhinnan i framför allt bakre ileum. De drabbade områdena kan variera från små nodulära öar till större områden med förtjockat, veckat epitel. Lindrig nekros kan ibland ses på små områden över det förtjockade epitelet, och subserosan kan vara ödematös. PIA drabbar främst yngre tillväxtgrisar (17, 22, 25).

Proliferativ haemorrhagisk enterit (PHE), drabbar främst de lite äldre grisarna, mer än fyra månader gamla, eller nyinfekterade besättningar. Denna akuta form har en mer uttalad inflammatorisk bild med olika inflammatoriska celler i lamina propria (17). Förtjockningen av mukosan kan vara något mindre uttalad, men med intestinala blödningar som verkar komma från mukosans underliggande kapillärbädd (17). Förutom blod kan blodkoagel och fibrinklumpar finnas i tarmlumen. Kraftiga blödningar kan orsaka anemi och akuta dödsfall

hos det drabbade djuret (25). Obducerade djur kan därför förutom den förändrade tarmen uppvisa bleka blodfattiga vävnader (22,25).

Nekrotiserande enterit (NE), anses vara en allvarlig sekundärinfektion av PIA. Den drabbar enskilda individer, men hos dessa är mortaliteten hög, då den som namnet antyder orsakar en koagulationsnekros av mukosan (17,22).

Regional ileit (RI), anses vara en avläkt form av NE, där den skadade mukosan ersatts av granulationsvävnad, vilket också resulterar i ett förtjockat muskellager över området. Andra infektioner än de orsakade av *Lawsonia intracellularis* kan resultera i NE med efterföljande RI. Vid PPE orsakad RI kan tarmen ha kvar proliferativa områden i anslutning till granulationsvävnaden (22).

Ovan beskrivna skador hittas framförallt i bakre delen av ileum, men kan även sprida sig eller breda ut sig framförallt längre ned i tarmsystemet som blindtarm och tjocktarm. Förändringar kan även ses i främre ileum och bakre jejunum (17, 22, 25,26).

Histologi

Den histologiska bilden i de förtjockade tarmområdena vid PIA visar hyperplasi av kryptornas epitel, där kryptorna blir djupare och förstörade. De utlinjeras av ihoppackade omogna epitelceller med hög delningshastighet och många mitoser, samt intracytoplasmatiske, smala, böjda, stavformade bakterier, vilka kan infärgas med Warthin-Starry-färgning (26).

Bägarcellerna är försvunna. Områdena brukar inte uppvisa någon tydlig infiltration av inflammatoriska celler (17).

De prolifererande mukosacellerna kan i vissa fall invadera Lamina propria, Mukosa muskularis (ett tunt muskellager beläget mellan lamina propria och subserosan, som ligger innanför det som brukar kallas "tarmens inre muskellager") och till och med den lokala lymfvävnaden i form av glandulära strukturer med celler innehållande intracellulära mikroorganismer (17).

Vid PHE hittas bakterierna förutom i kryptcellernas cytoplasma även i makrofager, löst i tarmlumen och i lymfvätska. Histologiskt ses även en kraftig stas av mukosans blodkärl (17).

Diagnostik

Det diagnostiska kriteriet för att fastställa PPE var tidigare baserat på paraffinbäddad, formalinfixerad vävnad som färgats in med hematoxylin-eosin samt Warthin-Starry silverfärgning. I de histologiska snitten syns krypthyperplasi och smala böjda cytoplasmatiske organismer apikalt i kryptcellerna (6).

Numera används PCR i allt högre utsträckning. PCRdiagnostiken har bäst känslighet när den appliceras på förändrad tarmvävnad (8). Dock måste grisen avlivas, vilket är en nackdel. Skulle en veterinär komma ut till en gård med diarréproblem där grisar har dött/avlivats kan en obduktion på gården snabbt ställa en preliminär diagnos om de specifika förändringarna på tarmen hittas, och ett par bitar påverkad tarm kan dels formalinfixeras för histologisk diagnos, dels skickas för PCR-diagnostik. PCR på faecesprov ger en något sämre känslighet och ett osäkrare resultat då organismen kan utsöndras intermittent (21, 8). Fördelen med denna provtagning är att den kan utföras på levande grisar. Metoden går därför bra att använda för att undersöka om en besättning med diarréer och tillväxtstörningar härbärgerar bakterien. Ett större antal prover riktat mot djur med sjukdomssymtom ger en större chans att påvisa smittan (9).

Serologi är en metod som också används för att ta reda på om grisen har utsatts för agens. Har individen antikroppar har den stött på mikroorganismen, men den kan antingen vara sjuk, härbärgera bakterien eller ha tillfrisknat från sjukdomen. Är individen mycket ung, yngre än 5-6 veckor, kan den också ha kvar maternella antikroppar (8, 14). En gris med nyss utvecklad

diarré har sannolikt inte hunnit utveckla antikroppar. Fördelen med serologi är även här att provtagningen kan utföras på levande individer.

Jämfört med träckprov är provtagningen krångligare, djuret måste fixeras (stora djur med brems och små djur i ryggsläge, vilket kräver en medarbetare). Själva blodprovstagningen kräver en viss vana hos den provtagande veterinären eftersom grisars blodkärl ligger mer dolda av späck och tjock hud vilket gör att de inte kan palperas eller stasas. De synliga kärlen på örat kan användas, men risk finns för hämatom och andra skador varför detta bör undvikas. Såvida grisen inte är nedsövd krävs en ännu högre grad av fixering för att hålla örat stilla.

Som tidigare nämnts har inte några odlingsförsök på artificiellt medium lyckats avseende *Lawsonia intracellularis* (3, 10, 17), utan odlingar har skett i cellkulturer, t ex speciella rått-enterocytlinjer, under ökat koldioxidtryck (16). Odling av bakterien utförs sällan för diagnos, utan används oftare för att rena fram infektionsdugliga bakterier under reinfektions-experiment (10).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR tekniken är den i nuläget mest använda diagnostiska metoden för att påvisa svårödlade sjukdomsagens. Den har många fördelar; det agens man letar efter behöver inte odlas, det behöver inte ens vara levande, bara dess DNA är någorlunda helt. Metoden är dock väldigt specifik, den påvisar bara det som efterfrågas, jämfört med t ex konventionell odling på agar där flera olika tänkbara agens kan växa ut. PCR används följaktligen mest på långsamväxande, svårtypade, svårödlade eller ej odlingsbara agens, med den riktade frågeställningen: finns just den här / de här organismerna?

Arbetstimmarna kan vara fler med PCR jämfört med t ex odling. Förpreparering av proverna och bearbetning av PCR-produkterna tar flera timmar och utförs i många fall manuellt. På grund av den snabba uppförökningen på ca två-tre timmar kan man ändå ha resultatet färdigt på en dag, vilket är snabbare än en konventionell odling med efterföljande arbete. Som exempel kan identifiering av salmonella nämnas, som efter vitalisering, selektering, odling och antigenidentifiering av underarter tar fem dagar. De preparerade proverna kan sedan sparas länge i fryst tillstånd, eftersom endast en liten del av provet används till PCR-processen.

PCR förutsätter att mikrobens DNA är känt, d v s att basparens inbördes ordning är kartlagd, i de delar som analyseras.

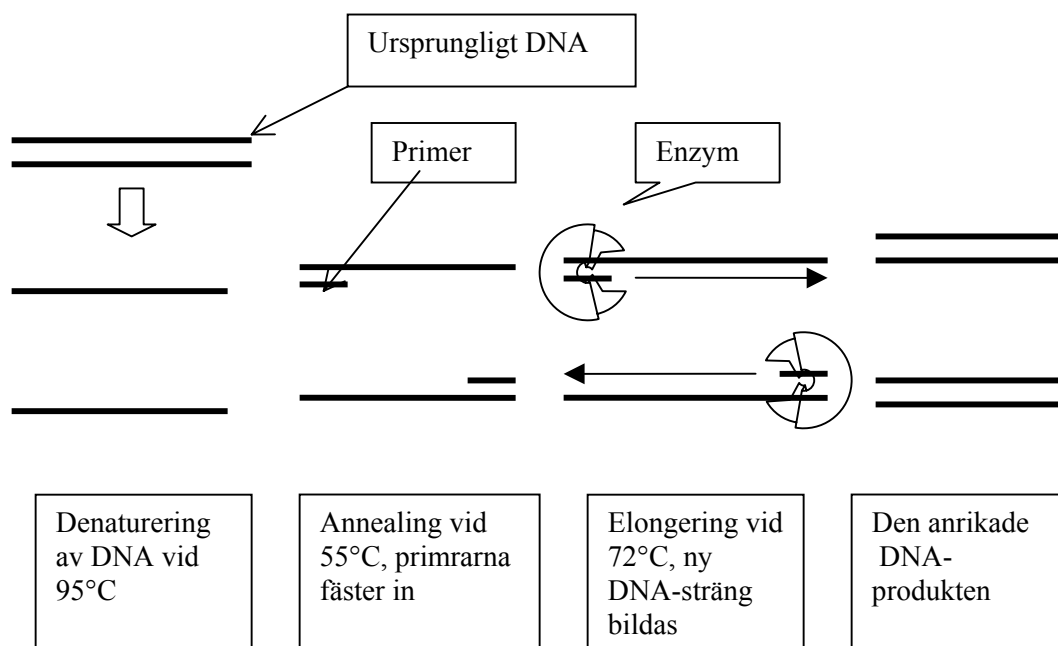
Vid prepareringen av ett prov inför PCR försöker man koncentrera och frigöra så mycket av mikroorganismernas DNA som möjligt genom att plocka bort ovidkommande och för PCR-processen störande material, samt bryta sönder cellväggar så att bakteriens DNA blir blottat (så kallad lysering). Många olika prepareringsmetoder finns utarbetade med olika för- och nackdelar. Valet av prepareringsmetod beror bland annat på vilket material provet består av.

Vid bearbetning för PCR väljs ett DNAsegment ut som är cirka 200-500 baspar långt och vars början och slut skiljer sig från andra mikroorganismers basparsordning (för att undvika korsreagens med andra agens). Två små mycket korta DNA-kedjor (cirka 20 baspar långa), primrar, designade för att passa på varje DNA-strängs ände sätts tillsammans med ett speciellt enzym (polymeras) till reaktionsmixturen där en liten mängd preparerat prov ingår. Enzymet har den egenheten att det med hjälp av lösa ”byggstenar”, nukleotider, och med den ursprungliga DNA-strängen som mall, kan fylla i den komplementära sträng som fattas.

Vid upphettning till 95°C delar sig de dubbelsträngade DNA-strängarna (denaturering). När temperaturen sänks till 55°C binder de två primrarna till var sin enkel DNAsträng (annealing). Genom att temperaturen höjs till 72°C börjar enzymet binda in nukleotider så att en ny dubbelsträngad DNasekvens bildas (elongering).

Denna cykel upprepas trettio gånger vilket ger en teoretisk anrikning på ca tusen miljoner DNAfragment per ursprunglig DNAsträng, dock brukar aldrig effektiviteten i varje cykel vara 100 %.

I figur 1 åskådliggörs en cykel i PCR-processen.

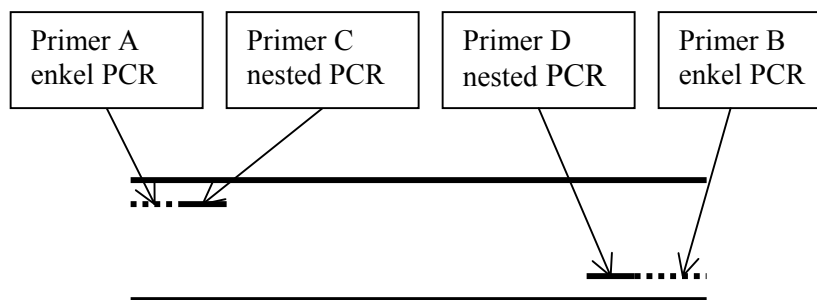


Figur 1. Schematisk beskrivning av en cykel i PCR-processen. Den dubbelsträngade DNA-molekylen säras (denaturering) till två enkla strängar som sedan fungerar som mallar för polymeras-enzymet, så att nya dubbelsträngade DNA-molekyler kan bildas.

Vid **nested PCR** används ett nytt primerpar som fäster precis innanför det ställe där de första primrarna fäster på DNA-fragmenten. En liten mängd av produkten från den första PCR-reaktionen förs över till ett nytt reaktionsrör med ny mastermix och nya primrar. Sedan utföres samma PCR-process som vid enkel PCR.

Risken för kontamination ökar när PCR-produkten från den enkla PCR-processen tillsätts, eftersom DNA i positiva prover har uppförökats till miljontals små DNA-fragment som lätt sprids med aerosol under hanteringen när locken till reaktionsrören öppnas. Denna ökade kontaminationsrisk är anledningen till att man vill undvika nested PCR i rutindagnostiken (8).

När PCR-processen upprepas resulterar detta i en förnyad exponentiell anrikning av PCR-produkter (ökad känslighet), samt en ökad specificitet eftersom risken att någon annan DNA-sekvens än den önskade anrikas minskar när fyra DNA-specifika primrar har använts. En ytterligare fördel är att delvis inhiberade prover som har för få PCR-produkter för att kunna avläsas i enkel PCR, blir ytterligare anrikade. Figur 2 visar schematiskt platserna för de olika primrarna på mikroorganismens DNA.



Figur 2. Schematisk skiss över primrarnas platser på den utvalda DNA-sekvens som ska anrikas vid enkel och nested PCR.

De färdiga PCR-produkterna analyseras genom att de får vandra i en agarosgel i ett elektriskt spänningsfält (elektrofores). En liten mängd av den färdiga PCR-produkten sätts till den färdiggjutna gelens brunnar tillsammans med en färg (GLS) som synliggör provet. Formen med gel är då nedsänkt i en elforesvagg vars buffert precis täcker gelen. När spänningen sätts på i bufferten vandrar de negativt laddade DNA-fragmenten mot den positiva polen. Elektroforesen avbryts när proverna vandrat tillräckligt långt i gelen, därefter läggs gelen i ett etidiumbromidbad för infärgning av DNA. Efter infärgningen läggs gelen på ett UV-ljusbord och fotograferas, de anrikade DNA fragmenten av samma storlek har vandrat lika långt i gelen och syns som ett ljust band. Bandens storlek uppskattas genom jämförelse med en markör, så kallad λ -stege, som består av konstgjorda DNA-molekyler i kända, varierande längder. Figur 3 visar en schematisk skiss över olika resultat i en agarosgel.

Inhibition

Ibland fungerar inte anrikningen i PCR-processen. Inhibitionen kan vara fullständig, där ingen uppförökning av DNA-fragment sker över huvud taget, eller delvis, där de uppförökade fragmenten är för få för att kunna uttydas (27).

PCR-processen kan hämmas på olika sätt; det kan naturligtvis bli fel på själva reaktionsmixturen, t ex att någon ingrediens saknas, eller är av dålig kvalitet (15).

Flera ämnen som finns i provet kan hämma processen, speciellt i biologiskt material, men många av dessa ämnen och deras inhibitionsförmåga är fortfarande outforskade. Exempel på de fåtal inhibitorer som är kända i faeces är gallsalter och komplexa polysackarider (sockerarter) (15).

De inhiberande substanserna kan verka på olika sätt: Lyseringen av cellerna under prepareringen kan förhindras. Ämnena kan inaktivera enzymet (DNA-polymeras), förstöra nukleotidernas struktur eller binda sig till dem så att de inaktiveras (15, 27).

En av orsakerna till att nested PCR oftare ger resultat på tidigare delvis inhiberade prover är att det sker ett utspädningssteg av det ursprungliga provets inhibitorer samtidigt som DNA sekvensen har uppförökats så pass att detektion trots utspädning fortfarande är möjlig (27).

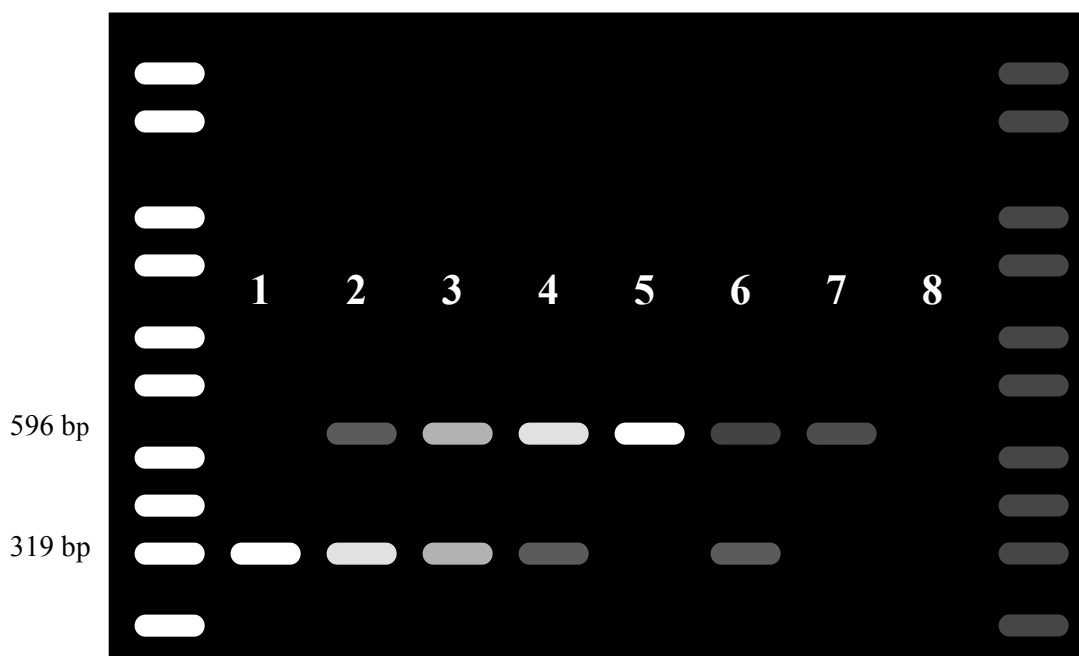
Mimic

Det är mycket viktigt för validiteten i ett försök att kunna skilja på negativa och inhiberade PCR-resultat, och för det ändamålet används en mimic som intern kontroll (7).

En mimic är en DNA sekvens vars uppbyggnad skiljer sig kraftigt från den utvalda sekvensen hos mikroorganismen, med undantag av platsen för primrarna längst ut i ändarna, som är identiska. Mimicens DNA-sekvens ska vara längre än mikroorganismens, så att de kan skiljas

från varandra efter vandringen i elektroforesen. Mängden mimicmolekyler skall vara samma som detektionsgränsen för mikroorganismens DNA, för att inte konkurrera ut denna (7).

Den längre mimic molekylen vandrar långsammare i gelen och syns vid ett negativt ej inhiberat prov. Är PCR-processen inhiberad syns inget band alls. Vid ett starkt positivt svar (högt antal PCR-produkter, högre andel mikroorganism-DNA än mimic-molekyler), syns bara ett band som vandrat lika långt som den positiva kontrollen. Är andelen mikroorganism-DNA bara några gånger högre, lika hög eller lägre än antalet mimic-molekyler syns mimicens band allt starkare, medan mikroorganismens band blir allt svagare (7). På så sätt kan man få en grov uppskattning av den mängd mikroorganism-DNA som finns i provet (figur 3).



Figur 3. Schematisk skiss över olika PCR-resultat som de ser ut på en agarosgel som fotograferats efter en elektrofores och infärgning. Längst till vänster; λ (lamda)-stege, en storleksmarkör. 1; Starkt positivt prov, 2; något mer PCR-produkter i provet än mimic-molekyler, 3; ungefär lika många PCR-produkter som mimic-molekyler, 4; något färre PCR-produkter än mimic-molekyler, 5; negativt prov, 6; något inhiberat, positivt prov, 7; något inhiberat negativt prov, 8; inhiberat prov, delvis eller fullständigt. Längst till höger; en otillräckligt infärgad lamdastege, etidiumbromid-badet behöver åtgärdas. bp = baspar. Storleken hos mimic; 596 bp, motsvarar storleken hos den mimic som används vid diagnostik av *Lawsonia intracellularis*, och storleken hos DNA-fragmentet, 319 bp, motsvarar storleken hos det DNA-fragment som analyseras i detta arbete.

Åtgärder, behandling

Lawsonia intracellularis känslighet *in vitro* för antimikrobiella preparat har testats i cellodlingar, där bakterien visade sig vara känslig för macrolider (erytromycin och tylosin), tetracykliner, pleuromuliner (tiamulin), penicilliner, och fluorokinoloner. Bakterien var däremot resistent mot aminoglycosider och aminocyklioler (neomycin, gentamicin och

apramycin) (18). Uppföljande experimentella försök tyder på att macrolider, lincosamider, klortetracyklin och tiamulin fungerar bra mot bakterien även *in vivo* (18).

Ett akut utbrott i nyinfekterad besättning kräver kraftfulla åtgärder i form av behandling av både sjuka djur och de individer som kommer i kontakt med dessa. Förslag på medicinering är 120 ppm tiamulin, 100 ppm tylosin, eller 400 ppm klortetracyklin i fodret i 14 dagar. Medicineringen kan även ges som peroral vattenlösning i 14 dagar, eller i jämförbar dos som intramuskulär injektion, i fem dagar (18).

Utomlands rekommenderas att djur som för första gången kommer i kontakt med smittämnet, eller nyintroduceras i en smittad besättning kan medicineras två veckor efter första smittotillfället. Djuren kan behandlas med 120 ppm tiamulin, 100 ppm tylosin, 110 ppm lincomycin, eller 300 ppm klortetracyklin i 14 dagar, för att förhindra sjukdomsutbrott (18).

Bakterien är svår att utrota ur en smittad besättning, och även om mikroorganismen inte orsakat några sjukdomsutbrott på flera år kan den finnas kvar och orsaka framtida besvär.

Preventiva åtgärder är som vid alla smittsamma sjukdomar upprätthållande av karantän och en god biosäkerhet inom besättningen, strikt omgångsuppfödning där äldre djur absolut inte blandas med yngre, god hygien som sänker smittrycket och en i övrigt bra djurhälsa som ger ett bättre immunförsvar (18).

Material och metoder

Besättningar

Gårdar valdes ut med hjälp av Svenska djurhälsovården AB till vilka 95 % av de svenska smågrisproducerande besättningarna är anslutna. Ett riktat urval gjordes av besättningar som tidigare hade haft problem med diarréer och försämrad tillväxt hos växande grisar och/eller tidigare diagnostiserats med *Lawsonia intracellularis*.

I studien ingick tolv gårdar. Två besättningar var lokaliserade i Skåne, och de övriga i Uppland. En gård besöktes och provtogs både före och efter ett åtgärdsprogram med peroral tylosinbehandling och miljösanering. Två besättningar hade gemensam ägare. Ytterligare en besättning hade utfört saneringsprogram för *Brachyspira hyodysenteriae*.

Djur

Tio grisar per besättning provtogs, vilket resulterade i sammanlagt 120 provtagna individer. De grisar som valdes ut skulle ha varit avvanda i minst två veckor för att undvika provtagning av djur med avvänjningsdiarré. Djur äldre än tretton veckor uteslöts eftersom dessa äldre ”pellar” med dålig tillväxt oftast drabbats av sekundärinfektioner.

Djuren skulle inte ha behandlats med antibiotika de senaste två veckorna innan provtagning.

Grisarna skulle ha diarré och uppvisa andra tecken på nedsatt hälsa (lång päls, försämrad aptit, avmagring, försämrad tillväxt eller/och rak svans) utan synbara tecken på övrig sjukdom. I de fall inte tillräckligt många sjuka grisar kunde upptäckas valdes långhåriga djur med sämre tillväxt ut, och i första hand sådana som visade tecken på snabb avmagring.

Provtagning

Provtagningen skedde från januari till september år 2004. Provtagningen utfördes av veterinärer och veterinärkandidater anställda eller studerande på SLU.

Från varje gris insamlades;

Ett blodprov från v. jugularis där serum sparades i frysen för framtida analys (dessa resultat ingår inte i föreliggande arbete).

Två tops från ändtarmen. Topsen förvarades i Amies kolade medium (Transssystem Amies W CH, Copan Italia, Brescia, Italien). Detta transportmedium används ofta till *Brachyspira*- och *Campylobacter*-undersökningar, och är ett transportmedium avsett för anaeroba bakterier. En av topsen sparades i frysen för senare analys.

Ett vanligt avföringsprov togs från ändtarmen (minst en sockerbits storlek) med hjälp av rektalhandske eller vid spontandefektering. Konsistens och färgavvikelser på avföringen noterades.

Hantering av proverna

Efter provtagningen transporterades proverna samma dag med bil till SLU, där blodproverna centrifugerades i 3000 varv/min i tio minuter. Serumet märktes och frystes i -80°C innan analys. Faecesproverna och culturetterna frystes också i -80°C för förvaring fram till analys.

Faecesproverna preparerades med två metoder per prov;

1) Preparering med koklysat (19) som endast avlägsnar vissa PCR-analyshämmande substanser, men som lämnar bakteriens DNAmolekyler i stort sett orörda. Detta ger en större känslighet, men ökar risken för att PCR-analysen inhiberas (8).

2) Preparering med QIAamp®DNA stool mini kit (Qiagen Inc., Valencia, Californien, USA), som tar bort många PCR-hämmande substanser men som förmodligen samtidigt avlägsnar en del av bakteriens DNA, vilket leder till en något sämre känslighet (1, 8). Denna metod används idag för rutindiagnostik på SVA.

Topsen preparerades först med QIAgen metoden ($n = 10$). Resterande tops ($n = 110$) preparerades med koklysat, av rädsla för att känsligheten skulle bli för låg.

För anrikning av mikroorganismens DNA-sekvens användes enkel och nested PCR. Enkel PCR användes på faecesproverna som hade preparerats enligt QIAgen-metoden, och på topsen som preparerats med koklysat. Nested PCR användes på faecesprover preparerade med koklysat, för att övervinna den förväntat höga inhiberingen (1, 3, 8). Dessutom analyserades de tops som inhiberats i den enkla PCR-processen även med nested PCR. Syftet med detta var att övervinna inhibitionen i så hög utsträckning som möjligt, för att kunna bedöma provmängdens betydelse för påvisandet av mikroorganismen, samt få en så god uppfattning som möjligt om den sanna infektionsstatusen hos varje besättning och individ.

Som intern kontroll användes en mimic, en 596 baspar lång DNA-sekvens som anrikas med samma primrar som *Lawsonia intracellularis* (fig. 3) (7). Mängden mimic som tillsattes var ungefär den samma som den önskade detektionsnivån (10^3) för mängden *Lawsonia*-organismer i proverna (7).

För att minimera miljökontamination utfördes olika moment av hanteringsgången i separata rum. Särskilt förberedelserna inför PCR-processen med blandandet av ingredienserna till PCR, och analyseringen av de färdiga PCR-produkterna, hölls åtskilda, och dragskåp som använts bestrålades med UV-ljus (27).

Preparering av faecesprover och tops med koklysat

Faeces och tops från samma gård preparerades vid samma tillfälle

0.9 – 1.3 mg frusen faeces per prov vägdes upp i 1,5 ml centrifugrör, där 2 ml avjoniserat, sterilt vatten tillsattes. Provet blandades väl genom skakning (vortexing), och inkuberades därefter i minst 15 min i rumstemperatur, varefter det centrifugerades i 2 min i $200 \times g$.

Supernatanten överfördes till nytt, låsbart 1,5 ml rör och centrifugerades i fem minuter, vid $15000 \times g$.

Supernatanten, innehållande lågmolekylära inhibitorer, kastades.

Pelleten löstes upp i 400 µl "lysis-buffert" (50 mM Tris-HCL, pH 8,4; 1 mM EDTA; 0,5 % Tween-20), varefter de låsta rören kokades i minst 10 minuter i vattenbad. Rören centrifugerades sedan i 30 sekunder vid 15000 x g. i kylt utrymme (-4°C). Denna process pellerade ytterligare inhibitorer och cellrester. Supernatanten pipetterades upp i nya märkta rör, och frystes sedan (-20°C) i väntan på PCR-analysen.

En tops från varje gris tinades i rumstemperatur medan faecesproverna preparerades. Större klumpar transportmedium avlägsnades från topsspetsen, som sedan stacks ner i centrifugröret och klipptes av. Efter omskakning utfördes processen enligt ovan med 15 minuters inkubering i avjoniserat, sterilt vatten.

Preparering av faeces med QIAamp®DNA Stool Mini Kit

Proverna preparerades enligt medföljda instruktioner till mini-kitet.

Utförande:

De ingående ingredienserna iordningställdes enligt tillverkarens instruktioner.

180-220 mg frusen avföring togs med hjälp av skalpell och vägdes upp i ett 2 ml mikrocenrifugrör varefter det placerades på is. 1,4 ml buffert sattes till varje prov, därefter skakades provet tills det var helt homogeniserat.

Lösningen upphettades i 70°C i 5 minuter, skakades, och centrifugerades i full hastighet i en minut.

1,2 ml av supernatanten överfördes till ett nytt 2 ml-rör, och resten slängdes.

En tablett InhibitEX™ sattes till varje prov, som skakades tills tabletten var helt löst. Proverna fick sedan stå i en minut för att inhibitorerna skulle hinna fästa till InhibitEXmatrix, sedan centrifugerades provet i full hastighet i tre minuter.

Supernatanten pipetterades till ett nytt 1,5 ml centrifugeringsrör och pelleten slängdes, varefter provet centrifugerades i full hastighet i ytterligare tre minuter.

Femton microliter Proteinase K pipetterades till nya 1,5 ml centrifugrör. Tvåhundra microliter av supernatanten tillsattes, och därefter 200 µl AL-buffert. Proverna skakades om innan de inkuberades i 70°C i 10 minuter.

Sist tillsattes 200 µl 96-100 % kall etanol (-20°C) till lysatet som sedan blandades.

Nya QIAamp-kolonner placerades i 2 ml rör och märktes. Hela provlösningen sattes till QIAamp-kolonnen, som centrifugerades med full hastighet i en minut, varefter de placerades i nya 2 ml rör. Rören med filtrat slängdes. QIAamp-kolonnerna öppnades och 500 µl buffert tillsattes, följt av centrifugering (full hastighet) i en minut. QIAamp-kolonnerna placerades i nya 2 ml rör och det gamla röret slängdes.

QIA-kolonnen öppnades en tredje gång och 500 µl buffert tillsattes följt av centrifugering i full fart i tre minuter. Röret med filtrat slängdes.

QIA-kolonnerna flyttades till uppmärkta 1,5 ml centrifugeringsrör och 200 µl buffert pipetterades direkt på QIAamp-membranet. Provet inkuberades i rumstemperatur i en minut, därefter centrifugerades kolonnerna med full hastighet i en minut för att frigöra DNA.

Filtratet sparades i -20 °C i väntan på PCR-analys.

Enkel PCR

Alla ingredienser (förutom enzymet) till reaktionsmixturen samt preparerat prov tinades innan PCR.

Ett PCR-protokoll upprättades, inkluderande datum, typ av PCR, provmärkning, ingående ingredienser, samt negativa och positiva kontroller. Per reaktionsrör tillsattes; 15,3 µl avjoniserat destillerat vatten, 2,5 µl PCR-buffert, 2,0 µl MgCl₂, 2,0 µl dNTP, 1,0 µl primer A

(medströms-primer) (11), 1,0 µl primer B (motströms-primer) (11), 1,0 µl mimic, 0,2 µl reaktionsenzym, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) och 1,0 µl templat (prov).

Vart femte rör var en negativ kontroll, som tillsattes för att upptäcka eventuell kontamination mellan proverna (som skulle resultera i falskt positivt svar). Som negativ kontroll användes ett rör med reaktionsmixtur och mimic men utan templat (prov). Som positiv kontroll användes rör innehållande reaktionsmixtur, mimic och templat med *Lawsonia intracellularis*-DNA framrenat från ett tidigare identifierat positivt vävnadsprov. Syftet med kontrollen var att kontrollera att PCR-processen hade fungerat.

PCR-rör plockades fram och numrerades. Kontrollerna markerades speciellt.

Reaktionsmixturen (förutom templat) blandades ihop i ett 1,5 ml centrifugrör enligt ovan och fördelades med 25 µl / reaktionsrör.

En mikroliter av de olika proven samt den positiva kontrollen sattes till respektive reaktionsrör enligt PCR-protokollet. Reaktionsrören placerades så fort som möjligt i PCR-apparaten. PCR-programmet bestod av; Hotstart (95°C i 10 minuter) följt av 35 cykler, där varje cykel består av denaturering vid 95°C i 30 sek, annealing vid 55°C i 30 sek, och elongering vid 72°C i 30 sek. När programmet var avslutat kyldes rören ned till 4°C.

Dragskåpen rengjordes och använt flergångsmaterial bestrålades med UV-ljus.

Nested PCR

Vid nested PCR användes en mikroliter av den färdiga PCR produkten som templat i en andra PCR. Templatet sattes till en ny mastermix enligt ovan med ett andra primerpar (primer C och D) (11). Mängden mastermix per reaktionsrör var 24 µl. När PCR-processen upprepades resulterade detta i en exponentiell anrikning av PCR-produkter (ökad känslighet), samt en säkrare specificitet.

Elektrofores, infärgning av gel och avläsning av resultat

En agarosgel gjöts i en form med mall för brunnar. Två mallar kunde användas per form, vilket resulterade i två rader med elektrofores-resultat. Antalet brunnar per rad varierade, beroende på mall, från tio upp till 18 st.

Två mikroliter GLS sattes per prov på en parafilm (mjuk, tjockare plastfilm) och blandades med 5 µl av den färdiga PCR-produkten.

Formen med den stelnade gelen sänktes ned i ett elfores-kar, så att gelen täcktes av TBE-buffert. Mallarna för brunnarna avlägsnades, och en storleksmarkör, (λ-stege, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige), sattes längst till vänster i varje rad. Därefter tillsattes proven och kontrollerna i brunnarna i känd ordning. Varje rad avslutades med en positiv kontroll längst till höger. Ström kopplades till elektrofores-karets kablar så att de negativt laddade DNA-molekylerna vandrade genom gelen mot den positiva elektroden. Spänning sattes på 90-115 volt i cirka 30-40 minuter (tills fragmenten vandrat tillräckligt långt för att separera från varandra). Ju högre spänning desto snabbare vandring, men för hög spänning resulterar i att bufferten blir för varm.

Efter elektroforesen infärgades gelen i ett etidiumbromid-bad i cirka 20 minuter.

När färgningen var klar avlästes och fotograferades gelen över ett UV-ljusbord.

För att minimera kontamination med etidiumbromid användes handskar i så hög utsträckning som möjligt.

Ett positivt prov resulterar i en 319 baspar lång PCRprodukt som syns som ljusa band vid bestrålning med UV-ljus. Den 596 baspar långa mimic-molekylen vandrar långsammare i gelen.

Resultat

Besättningar

Lawsonia intracellularis påvisades hos en tredjedel av besättningarna (minst ett positivt svar). Inget av proverna från de skånska besättningarna eller besättningarna med gemensam ägare var positiva. Den gård som provtogs före och efter genomförandet av ett åtgärdsprogram hade positiva provresultat vid båda tillfällena, tio individer före respektive tre individer efter. Även besättningen som sanerats mot *Brachyspira hyodysenteriae* var positiv avseende *Lawsonia intracellularis*.

Tabell 1. Resultat från 12 besättningar analyserade avseende förekomst av Lawsonia intracellularis. Från varje besättning insamlades 10 faecesprov och tio tops, med undantag av en besättning där 6 faecesprov och tio tops insamlades. Faecesproverna (F) preparerades med två olika metoder, koklysat(kok) och QIAgen (QIA). Topsen preparerades med koklysat. Faecesprov preparerade med koklysat har analyserats med nested PCR, koklysat-preparerad tops och QIAgen (F) med enkel PCR. Positiva = minst ett positivt provresultat / besättning, övriga kan vara negativa eller inhiberade. Negativa = enbart negativa prover (ingen inhibition). Inhiberade = minst ett inhiberat prov, övriga kan vara både positiva och negativa. Initialt = resultaten av den första PCR-analysen. Slutliga = resultat efter fortsatt analysering av initialt inhiberade prov. En gård kan förekomma flera gånger eftersom de inhiberade proverna kom från besättningar där övriga prover var positiva eller negativa.

Resultat besättningar	Antal besättningar					
	Initialt			Slutliga		
	Kok (F)	Tops	QIA (F)	Kok (F)	Tops	QIA (F)
Positiva	4 (31 %)*	2 (17 %)*	3 (25 %)*	4 (33 %)*	3 (23 %)*	3 (23 %)*
Negativa	6 (46 %)	6 (50 %)	6 (50 %)	6 (50 %)	10 (80 %)	9 (77 %)
Inhiberade	3 (23 %)	4 (33 %)	3 (25 %)	2 (17 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Summa	13 (100 %)	12 (100 %)	12 (100%)	12 (100 %)	13 (100 %)	13 (100%)

*I en besättning saknades faeces från fyra djur, och endast tops analyserades från dessa individer. Detta påverkar inte resultaten på besättningsnivå, varför denna besättning är inkluderad i tabellen.

Fyra gårdar hade negativt resultat på samtliga prover. Av de provtagna grisarna på en av dessa fyra gårdar hade 10 djur diarré. Tre gårdar saknade uppgift om diarréförekomst hos de provtagna grisarna. En av dessa gårdar hade, enligt en bedömning av frusen faeces inte någon kraftigare diarré hos de provtagna grisarna. Ytterligare en gård bedömdes med hjälp av det frusna provmaterialet ha fem diarrégrisar. Sista gården bedömdes ha två individer med diarré.

Fyra besättningar hade huvudsakligen negativa provresultat där resterande prover var inhiberade. I tre av dessa besättningar hade samtliga djur avföring av normal konsistens vid provtagningstillfället. Den fjärde gården hade nio diarrégrisar av de tio provtagna.

I fyra gårdar påvisades positiva prov när faeces analyserades med koklysat (vilket också överensstämde med den slutliga bedömningen, när alla inhiberade prover analyserats

ytterligare), två besättningar av dessa fick positiva resultat när tops analyserades med koklysat, och tre besättningar fick positiva resultat när faeces analyserades med QIAgen (se tabell 1).

Här följer en noggrannare redogörelse på besättningsnivå över individernas provresultat och diarréfrekvens hos de besättningar som var positiva avseende *Lawsonia intracellularis*:

- En besättning hade fem grisar som var negativa vid PCR på samtliga prepareringar, tre individer var negativa på tops och positiva på faecesprepareringarna (QIAgen plus koklysat), samt två grisar var negativa på koklysat av tops plus QIAgen preparering av faeces, och positiva på koklysat preparering av faeces. Alla grisar (n = 10) hade diarré.
- En gård hade fyra individer som var negativa på samtliga prepareringar, varav en hade diarré. Två grisar var negativa efter koklysat av tops plus QIAgen preparering av faeces, och positiv på koklyserad faeces. Tre grisar hade negativt resultat på faecesprepareringarna, medan topsen var inhiberad. Hos en gris var båda koklysaten (tops plus faeces) inhiberade, medan QIAgen preparerad faeces var negativ. Ingen av de sex senast nämnda individerna hade diarré.
- En besättning hade tre grisar som var negativa på koklysat av tops och QIAgen preparerad faeces, och var positiva på koklysat av faeces, varav en individ hade diarré. Två individer var negativa efter QIAgenpreparering av faeces, och positiva efter koklysat (faeces plus tops), och båda dessa hade diarré. Fem grisar var positiva på samtliga prepareringar och två av dessa hade diarré.
- En gård hade en individ som var negativ vid koklysat av tops plus QIAgen preparering av faeces, och positiv på koklysat av faeces. Fem individer var positiva vid samtliga prepareringar. Fyra individer var positiva vid koklysat av tops, men hade för lite insamlad faecesmängd för att några koklysat- eller QIAgenprepareringar på faeces skulle kunna göras. Uppgifter om diarré saknades från denna gård, men en bedömning av den nedfrusna avföringen visar tydlig diarré hos en majoritet av de sex kvarvarande proven, och dessutom blodinblandning i två.

I tabell 2 ses det initiala utfallet av de tre prepareringarna (koklysering av faeces och tops, samt QIAgenpreparering av faeces) från de fyra besättningar där *Lawsonia intracellularis* påvisats.

Tabell 2. Utfallet vid analys av prov från grisar i de fyra besättningar där *Lawsonia intracellularis* påvisats. Resultaten från två olika provtagningsmetoder (tops och faeces) och två olika prepareringsmetoder jämfördes. Faecesproverna (F) preparerades med två olika metoder, koklysat (Kok) och QIAgen (QIA). Topsen preparerades med koklysat. Kok (F) har analyserats med nested PCR. Koklysat preparerad tops och QIAgen (QIA) faeces har analyserats med enkel PCR. Provtagna grisar (n =36) var sju till tolv veckor gamla.

Antal individer	Kok (F)			Tops			QIA (F)		
	Pos	Neg	Inh	Pos	Neg	Inh	Pos	Neg	Inh
10	X			X			X		
2	X			X				X	
3	X				X		X		
8	X				X			X	
3		X				X		X	
9		X			X			X	
1			X			X		X	
Summa	23	12	1	12	20	4	13	23	0

Ingen signifikant skillnad mellan de olika prepareringarnas resultat på besättningsnivå kunde påvisas (McNemar's test), förmodligen därför att materialet i den här studien var för litet.

Prepareringarna

Initialt blev 265 stycken prover negativa i samtliga analyser (koklysat av faeces och tops samt QIAgen preparering av faeces), medan 52 prover blev positiva. De initialt inhiberade proven uppgick till 35 stycken. Åtta prepareringar kunde inte genomföras på grund av otillräcklig mängd faeces (fyra koklysat och fyra QIAgen).

Inhiberade prov analyserades ytterligare för att få en sannare bild av analysmetodernas tillförlitlighet. Faeces preparerad med koklysat analyserades ytterligare en gång med nested PCR. PCR-produkterna på topsen analyserades med nested PCR, och en enkel PCR upprepades på faeces preparerad med QIAgen.

Resultaten efter den utvidgade analysen av inhiberade prover ledde till att det slutliga resultatet blev 292 negativa prover, 54 positiva prover, och sex inhiberade prover.

Tabell 3 sammanfattar utfallet för alla prepareringar (koklysat av faeces och tops, samt QIAgenpreparering av faeces) innan (initialt) och efter (slutligen) ytterligare PCR-analys.

Tabell 3. Sammanställning av analys av samtliga faecesprov med PCR avseende *Lawsonia intracellularis*. Totalt provtogs 120 djur, varav fyra utgick p g a för liten mängd provmaterial. Från varje individ insamlades faeces och tops. Faecesprov preparerade med koklysat har analyserats med nested PCR, tops preparerad med koklysat och QIAgen-preparerad faeces har analyserats med enkel PCR. Provtagna grisar (n = 116, då fyra räknats bort) var sju till tolv veckor gamla. Kok = koklysat, QIA = Qiagen, (F) = faeces. Initialt = provresultaten efter en första PCR analys. Slutligen = provresultat efter fortsatt PCR-analys av initialt inhiberade prover.

Resultat	Antal grisar					
	Initialt			Slutligen		
	Kok (F)	Tops	QIA (F)	Kok (F)	Tops	QIA (F)
Positivt	23 (20%)	12 (10 %)	13 (11 %)	24 (21 %)	13 (11 %)	13 (11 %)
Negativt	77 (66%)	93 (80 %)	95 (82 %)	86 (74 %)	103 (89 %)	103 (89 %)
Inhiberat	16 (14%)	11 (9,5%)	8 (6,9%)	6 (5,2%)	0 (0%)	0 (0 %)
Summa	116	116	116	116	116	116

Djur

Från tre av besättningarna saknades uppgifter om ålder hos de provtagna grisarna. Övriga provtagna individer var mellan sju och tolv veckor gamla.

Efter en första analys var 27 individer av totalt 120 positiva avseende förekomst av *Lawsonia intracellularis* i avföringen. Avföringsmängden var för liten i fyra prov för att kunna prepareras med koklysat- eller QIAgen. Dessa individer där det positiva utslaget enbart bekräftats på tops fick därför utgå ur beräkningarna.

Av de återstående 23 proverna var 23 prepareringar med koklysat (faeces), 12 koklysat (tops), och 13 QIAgen (faeces) positiva (tabell 3). Tio individer var positiva på alla tre prepareringarna, åtta var positiva på koklysat (faeces) och negativa på tops plus QIAgen (faeces), två var positiva på koklysatprepareringarna (faeces plus tops) och negativa på QIAgenprepareringarna. Tre individer var positiva på koklysat (faeces) plus QIAgen (faeces) och negativa på koklysat (tops) (tabell 3).

Sextiotvå grisar var initialt negativa på samtliga prepareringar.

Sexton prov preparerade med koklysat av faeces var inhiberade. Av dessa 16 prov var ett även inhiberat på koklysat av tops, medan ett annat prov var inhiberat vid QIAgenpreparering av faeces. Åtta prov var initialt inhiberade på enbart koklyserad tops, medan två var inhiberade på både tops och faeces preparerad med QIAgen. Fem prov var initialt enbart inhiberade vid Qiagen-preparering av faeces.

Efter ytterligare analysering av inhiberade prov blev totalt 86 individer negativa vid samtliga prepareringar. Prover från sex grisar som preparerats med koklysat (faeces) var fortfarande inhiberade. En gris där prover initialt var inhiberade vid preparering av koklysat av faeces och tops blev efter upprepad analys positiv avseende *Lawsonia* vid båda dessa prepareringar (provet var negativt vid preparering med QIAgen).

De utökade analyserna ledde till att det slutliga antalet positiva resultat steg från initialt två till slutliga tre stycken grisar vars prover var positiva på koklysat av faeces och tops, men

negativa på QIAgen-preparering av faeces. Detta ledde också till att totalt antal slutligt positiva grisar avseende bakteriens förekomst steg från initiala 23 till slutliga 24 stycken. (Exakta provresultat och samband med diarré på individuell nivå finns i tabell 4).

*Tabell 4. Redogörelse för utfallet på individnivå vid jämförelse mellan två olika provtagningstekniker samt två olika prepareringar; koklysat-preparering av faeces och tops samt QIAgen preparering av faeces. Faecesprov preparerade med koklysat har analyserats med nested PCR, tops preparerad med koklysat och QIAgen-preparerad faeces har analyserats med enkel PCR avseende *Lawsonia intracellularis*. Provtagna grisar (n = 120) var sju till tolv veckor gamla. Kok = koklysat av faecesprov, QIA = QIAgenpreparering av faeces, Initialt = provresultaten efter en första analys, Slutligen = provresultat efter fortsatt analys av initialt inhiberade prover. P = positiv, N = negativ, I = inhiberad.*

Kok / tops / QIA	Antal grisar initialt	Antal grisar med diarré	Antal grisar slutliga
N / N / N	62 (9*)	27 (6*) (10 saknar uppgift)	86
N / N / I	5 (0*)	4 (0*)	0
N / I / N	8 (3*)	3 (0*)	0
I / N / N	14 (0*)	0 (0*)	6
N / I / I	2 (0*)	1 (0*)	0
I / N / I	1 (0*)	0 (0*)	0
I / I / N	1 (1*)	0 (0*)	0
P / P / P	10	2(5 saknar uppgift)	10
P / N / N	8	3(1 saknar uppgift)	8
P / P / N	2	2	3
P / N / P	3	3	3
- / P / - **	4	(uppgift saknas)	4
Summa	120		120

(*) Antal individer som kommer från gårdar positiva avseende *Lawsonia intracellularis*.

**Endast tops har analyserats då mängden avföring var för liten för preparering på faeces (Kok + QIA).

Skillnaden mellan resultatet på positivt koklysatpreparerad tops resp QIAgen (f) gentemot de individer som slutligen bedömts som positiva hade en signifikans på $p = 0.001$ resp $p < 0.01$. Ingen signifikant skillnad kunde uppmätas mellan de positiva resultaten på koklyserad tops och QIAgenpreparerad faeces, eller mellan koklyserad faeces och den slutliga bedömningen (McNemar's test).

Inhibition

Totalt 30 av 240 (12,5 %) prov från åtta besättningar utan påvisad förekomst av *Lawsonia* organismen var inhiberade (närmare uppgifter om fördelningen av inhibition finns under ovanstående rubrik "Djur").

Fem av 116 (4,3 %) prov från de fyra besättningar där *Lawsonia intracellularis* påvisats var inhiberade. (En gård hade enbart sex provtagna grisar, då mängden provmaterial från

resterande fyra grisar var för litet för att analyseras. Grisar preparerade med enbart topsprov är ej medtagna i beräkningarna). Tabell fem jämför inhiberingen vid olika prepareringar och mellan besättningar som var negativa respektive positiva avseende påvisad förekomst av *Lawsonia intracellularis*.

Tabell 5. Jämförelse av inhibering mellan positiva och negativa besättningar fördelat på de olika prepareringarna. Faecesprov preparerade med koklysat har analyserats med nested PCR, tops och QIAgen-preparerad faeces har analyserats med enkel PCR avseende *Lawsonia intracellularis*. Provtagna grisar ($n = 116$) var sju till tolv veckor gamla. Negativa besättningar = de gårdar vars provresultat efter fortsatt PCR-analys inte har något positivt utslag. Positiva besättningar = de gårdar vars provresultat blivit positiv hos minst en gris.

	Inhibering		
	Koklysat (faeces) (antal inhiberade prov/totala antalet prov)	Koklysat+QIAgen (tops) (antal inhiberade prov/totala antalet prov)	QIAgen (faeces) (antal inhiberade prov/totala antalet prov)
Negativa besättningar	18,8 % 15/80*	8,75 % 7/80	7,50 % 6/80
Positiva besättningar	2,78 % 1/36	11,1 % 4/36	0,00 % 0/36

*Signifikans; $p < 0,05$ (skillnad i inhibition mellan gårdar där bakterien påvisats och gårdar där bakterien inte påvisats; chi²-test).

Trettiofyra av totalt 276 (12,0 %) prov var initialt inhiberade, och negativa (eller inhiberade) efter upprepade analys. Dessa grisar som inte fått något positivt utslag på någon preparering bedömdes slutligen som negativa avseende *Lawsonia intracellularis*. Sex prov var fortfarande inhiberade efter upprepade analys av koklysat-preparerad faeces.

Två av 74 (2,7 %) prov var initialt inhiberade hos de slutligen positivt bedömda individerna. I tabell sex jämförs de olika prepareringarnas initiala inhibering mellan individer som slutligen bedömts vara negativa respektive positiva avseende påvisad förekomst av *Lawsonia intracellularis*.

Tabell 6. Jämförelse av inhibering mellan positiva och negativa individer fördelat på de olika prepareringarna. Faecesprov preparerade med koklysat har analyserats med nested PCR, tops och QIAgen-preparerad faeces har analyserats med enkel PCR avseende *Lawsonia intracellularis*. Provtagna grisar ($n = 116$) var sju till tolv veckor gamla. Negativa individer = de grisar vars provresultat efter fortsatt PCR-analys inte har något positivt utslag på någon preparering. Positiva individer = de grisar vars provresultat blivit positiva i en eller flera prepareringar.

	Inhibering		
	Koklysat (faeces) (inhiberade prov/ totala antalet prov	Koklysat+QIAgen (tops) (inhiberade prov/ totala antalet prov	QIAgen (faeces) (inhiberade prov/ totala antalet prov
Negativa individer	16,3 % 15/92	10,9 % 10/92	8,70 % 8/92
Positiva individer	4,17 % 1/24	4,17 % 1/24	0,00% 0/24

Av de 35 initialt inhiberade proverna var; 16 koklysat (faeces), 11 koklysat (tops), och 8 QIAgen (faeces), vilket gav inhiberingar på 16/116 (13,8 %), 11/116 (9,5 %), respektive 8/116 (6,9 %).

Den enda signifikans som kunde uppmätas vad gäller inhibition var beträffande koklysatpreparerad faeces vid en jämförelse mellan gårdar som bedömts positiva respektive negativa avseende *Lawsonia intracellularis* (Chi²-test, tab. 5).

Diskussion

Av totalt 24 slutligt positiva analysresultat bedömdes 12 som positiva vid den initiala analysen av provtagning med tops. Provtagningstekniken visar därmed samma eller sämre känslighet än den teknik som idag används vid rutindiagnostik (preparering av 0,2 gram faeces med QIAgen) där 13 prov initialt var positiva.

Andelen initialt inhiberade tops var 11 st (9,5%), vilket var fler än vid preparering med QIAgen, 8 st (6,9 %). Det sammanvägda resultatet av känslighet och inhibition gör koklysatpreparering av tops till ett sämre alternativ vid rutindiagnostik av *Lawsonia intracellularis* jämfört med QIAgenpreparering av faeces, när enstaka individuella prover skall analyseras. Då känsligheten vid diagnostik av faeces inte är optimal (störst känslighet har enkel PCR-analys av fenol-kloroform preparerad tarmmukosa (8) innebär detta att koklysatpreparering av tops i praktiken har ännu sämre känslighet. Topsens känslighet i detta försök var 50 % (12/24), och en smittad individ som utsöndrar mikroorganismen i avföringen skulle då ha mindre än 50 % chans att diagnostiseras korrekt. Det är likaledes tveksamt att använda provtagningsmetoden i prevalensstudier utan riktad provtagning och på ett fåtal individer per besättning.

Däremot kan tekniken eventuellt användas vid utredning av akuta diarréutbrott eftersom resultaten antyder att antalet inhiberade prov är färre hos positiva individer, och eftersom akut sjuka djur troligen utsöndrar fler bakterier. Vid ett diarréutbrott orsakat av *Lawsonia intracellularis* där flera individer med symtom kan provtas finns därför goda förutsättningar att påvisa mikroorganismen. Vid ett stort diarréutbrott där den individuella diagnosen är av mindre vikt, brukar det dock finnas gott om provmaterial som lätt kan samlas in. Fördelen med provtagning med tops skulle i så fall vara en bekväm och säker transportförpackning.

Eftersom bakterien är vanligt förekommande i svenska svinbesättningar kan ett diarréutbrott med blygsam utsöndring av bakterien ha andra/ytterligare bakomliggande orsaker.

Besättningar

Med tanke på det riktade urval som gjordes, och den förväntade prevalensen på 48 % (9), är det förvånande att endast en tredjedel av de besökta besättningarna befanns vara positiva (om förväntad sjukdomsfrekvens inom en besättning beräknats till 30 % borde åtminstone en infekterad individ per besättning ha provtagits med 95 % säkerhet, då tio grisar provtas) (9). Någon eller några besättningar kan ha fått en falsk, negativ bedömning eftersom besöken inte alltid skedde i samband med diarréutbrott, varför bakterien kan ha utsöndrats i lågt antal. Dock visar resultaten från två gårdar, där merparten av de provtagna grisarna hade diarré (n = 9 respektive 10) men var negativa avseende *Lawsonia intracellularis*, att andra orsaker till diarréproblem i svinbesättningar inte får glömmas bort.

Två besättningar hade ett stort antal inhiberade prov; sju koklysatprepareringar av faeces per besättning initialt, och tre inhiberade koklysat av faeces per besättning slutligen. Inget av de provtagna djuren hade diarré, och några positiva prov kunde inte identifieras. Besättningarna kan ha härbärgerat en subklinisk infektion, men det är mer troligt att de inhiberade proverna var negativa.

Två av fyra positiva besättningar identifierades vid provtagning med tops, vilket i praktiken innebär att även på besättningsnivå ligger detektionsnivån under 50 %, trots att tio stycken individer provtagits på varje gård. Vid QIAgen-preparering av faeces kunde tre av fyra besättningar identifieras som positiva, vilket ger en detektionsnivå på mindre än 75% i praktiken. Skillnaden mellan de två prepareringarnas detektionsförmåga är inte signifikant, men antyder att koklyserad tops har samma eller sämre detektionsförmåga än QIAgen-preparerad faeces.

Ett intressant och svårförklarligt fenomen är den ringa skillnad och till och med ökning av inhibering som sker hos prepareringarna av tops från negativa (8,8 %) till positiva (11 %) gårdar avseende *Lawsonia*-förekomst. Detta går rakt emot resultaten på koklysat (faeces) och OIAgen (faeces) där framför allt koklysatprepareringarna av faeces (19 % resp 2,8 %) uppvisar en påtaglig lägre inhibering i de besättningar som bedömts positiva avseende bakteriens förekomst (Tabell 5). Siffrorna kan vara slumpmässiga eftersom signifikans saknas.

Koklysatpreparering av faeces är den enda preparering som uppvisar någon signifikant skillnad mellan positiva och negativa gårdar vad gäller inhibition.

Förekomsten av bakterien i de två besättningar där bekämpning skett mot *Lawsonia*-respektive *Brachyspira*- bakterier antyder att eventuell förekomst av okända reservoar och smittvägar inte kan uteslutas, även om den troligaste källan för bakterien är en symtomlös smittbärande gris (3). Bakteriens överlevnad i miljön sägs vara 14 dagar, och den har en bred värdsspecificitet. Detta kan vara en försvårande faktor vid bekämpning av mikroorganismen, där till exempel fåglar och gnagare skulle kunna vara möjliga smittbärare (3).

Djur

Mängden mikroorganismer utsöndrade i avföringen är troligen störst i samband med diarré. Hos smittade individer utan diarré utsöndras bakterien intermittent eller endast vid enstaka tillfällen. Detta gör det viktigt att provta individen vid rätt tillfälle (d v s vid diarrétillstånd).

Då de prover som var inhiberade efter den initiala analysen delas upp på negativa och positiva individer, baserat på den slutliga bedömningen, syns en mindre grad av inhibition hos de grisar vars prover slutligen bedömts positiva (tab. 6). Detta antyder att ett inhiberat prov med större sannolikhet är negativt än positivt, även om materialet i denna studie var för litet för att kunna påvisa någon signifikant skillnad i inhibition på individnivå.

Sex grisar förtjänar extra uppmärksamhet. De hade alla positivt resultat på koklysatpreparerad tops, medan tre var positiva på QIAgen (faeces) och negativa på tops. De andra tre var negativa på QIAgenpreparerad faeces, och positiva på den slutliga bedömningen av tops (en tops var initialt inhiberad). Den minskade känsligheten i de två olika prepareringarna baseras följaktligen inte helt på samma djur. Detta innebär att förutom inhibition, prover med liten mängd mikrobiellt DNA kan vara svårare att detektera och ge falskt negativa resultat.

Prepareringar

Nested PCR på koklysatpreparerad faeces användes i det här försöket för att höja sensibiliteten, och på så sätt få en sannare bild av smittläget i besättningarna liksom av antalet smittbärande individer. För att kontrollera att proverna inte kontaminerats under analyseringshanteringen inkluderades negativa kontroller vart femte reaktionsrör.

Av dessa negativa kontroller var en positiv vid nested PCR av koklysat (faeces). Den besättning vars prover analyserades vid detta tillfälle hade sex faecesprover och tio tops. Alla (n = 6) koklysat (faeces) var positiva, nio av tio tops var positiva liksom fem QIAgen (faeces). Samma gris var negativ på tops och QIAgen, vilket gör den till enda eventuellt falskt positiva individen i denna besättning. Eftersom alla övriga provtagna individer i denna besättning var positiva avseende *Lawsonia intracellularis* är det troligare att även denna gris utsöndrade bakterien, men i så liten mängd att de mindre känsliga koklysat (tops)- och QIAgen (faeces) prepareringarna inte givit utslag.

De första topsen var preparerade med QIAgen (n = 10). Dessa prov härstammade från en gård där samtliga prepareringar var negativa, och utan inhibition initialt. Detta ledde till att vi bedömde att resultaten kunde räknas ihop med övriga topsprover preparerade med koklysat. Då inget faecesprov var inhiberat, bör inte heller resultaten avseende inhibition ha kunnat påverkas märkbart.

Provtagningstekniker

Ett avföringsprov kräver en lugn och samarbetsvillig gris (mycket ovanligt), eller en fixerad gris, vilket kräver en medarbetare eller extra utrustning (ett tredje alternativ är en tålmodig provtagare med gott om tid som kan vänta ut en spontandefektering från varje gris som ska provtas). För att kontaminationsrisken ska minimeras bör spontandefektering snabbt fångas upp, vilket i praktiken är svårt. Avföringen kan förvaras i en ut och invänd rektalhandske, eller i en burk. Båda förvaringssätten är något klumpigare och utrymmeskrävande än den färdiga plastcylindern för culturetten. Själva rektaliseringen bör utföras av en veterinär. Provtagning med tops är enklare, grisen behöver inte fixeras i lika hög grad, och provtagningen skulle kunna utföras av djurägaren själv.

Då tops med Amies kolade medium är ett transportmedium för anaeroba bakterier skulle en eventuell odling avseende andra, odlingsbara anaeroba kunna utföras från samma provtagning. Eftersom avföringsmängden från början kan vara ytterst liten skulle detta dock kunna sänka känsligheten ytterligare. Vid faecesprovtagning används en uppvägd mängd avföring och så är inte fallet med topsprovtagningen. Faecesmängden på tops är alltid mindre, och kan inte vägas upp med någon exakthet.

En ytterligare nackdel med tops är att de är förbrukade efter prepareringen, och skulle prepareringen misslyckas eller en annan prepareringsmetod testas måste fler tops tas från samma individ. En större mängd frysförvarad avföring kan återanvändas som provmaterial. I en artikel (17), diskuteras det att påvisbarheten för det mikrobiella DNA som finns i fryst faeces allvarligt försämras efter tio månader. Analys av referensprover på SVA visar dock inte någon försämrade känslighet på faecesprover frysta sedan flera år i -80°C (opublicerade data).

Mimic

I de fall ingen mimic används under PCR-processen ökar andelen falskt negativa resultat, eftersom det inte går att skilja mellan inhiberade och negativa prover. Används en för stor mängd mimicmolekyler i analysen ökar också de falskt negativa svaren eftersom molekylen då konkurrerar ut mikroorganismens DNA i ett svagt positivt prov. Tidigare analyser (7), visar att 10³ mimicmolekyler är optimalt för PCR på faeces.

Slutsatser

Resultaten i denna studie visar att provtagning med tops endast är tillräckligt känsligt för att påvisa *Lawsonia intracellularis* vid diarréutbrott med hög utsöndring av *Lawsonia intracellularis* hos ett flertal individer.

Den nuvarande provtagningstekniken med QIAgenpreparerad faeces är lika bra eller något bättre jämfört med koklysatpreparerade tops vad gäller känslighet och inhibering.

De gårdar som trots åtgärdsprogram mot *Lawsonia intracellularis* och *Brachyspira*-bakterier uppvisade positiva provresultat, visar att *Lawsonia intracellularis* är en tarmpatogen som det är svårt att bli av med i smittade besättningar. Bakterien kan finnas kvar trots att inga diarréutbrott ses och prov på faeces inte påvisar bakterien.

Tack

Stiftelsen Lantbruksforskning som finansierat detta projekt.

Litteraturförteckning

1. Boom, R., Sol, C., Weel, J., Lettinga, K., Gerrits, Y., van Breda, A., Wertheim, Van-Dillen, P., 2000. Detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in faeces. J. Virol. Methods 84, 1-14.
2. Bundgaard, H., 2000. Attempt to eliminate *Lawsonia intracellularis* in a new established high health sow herd. The 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne, Australia, p. 69.
3. Cooper, D.M., Gebhart, C.J., 1998. Comparative aspects of proliferative enteritis. JAVMA. 212: 9, 1446-1451.
4. Finegold, S., 1992. Clinical importance of *Bilophila wadsworthia*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. 11:1058-1063.
5. Flø, H., Bock, R., Opegaard, O.J., Bergsjø, B., Lium, B., 2000. An attempt to eradicate *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* sp. from swine herds. The 16th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Melbourne, Australia, p. 66.
6. Gebhart, C. J., Barns, S. M. McOrist, S., Lin, G -F., Lawson, G. H. K., 1993. Ileal Symbiont Intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfibrio* species. Int. J. Syst. Bact. 43:3, 533-538.

7. Jacobson, M., Englund, S., Ballagi-Pordány, A., 2003. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. J. Vet. Diagn. Invest. 15, 268-273.
8. Jacobson, M., Aspan, A., Heldtander Köningsson, M., Hård af Segerstad, C., Wallgren, P., Fellström, C., Jensen-Waern, M., Gunnarson, A., 2004. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. Vet. Microbiol. 102, 189-203.
9. Jacobson, M., Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N., Fellström, C., The prevalence of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and Wild boar population. Vet. Med. B. *In manuscript*.
10. Joens, L.A., Nibbelink, S., Glock, R.D., 1997. Induktion of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*. Am. J. Vet. Res. 58, 1125-1131.
11. Jones, G.F., Ward, G.E., Murtaugh, M.P., Lin, G.-F., Gebhart, C.J., 1993. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, Ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 2611-2615.
12. Kim, O., Kim, B., Chae, C., 1998. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in selected pig herds in Korea as determined by PCR. Vet. Rec. 143, 587-589.
13. Klein, E.C., Gebhart, C.J., Duhamel G.E. 1999. Fatal outbreak of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. J. Med. Primatol. 28, 11-18.
14. Knittel, J.P., Jordan, D.M., Schwartz, K., Janke, B.H., Roof, M.B., McOrist, S., Harris, D.L., 1998. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. Am. J. Vet. Res. 59, 722-726.
15. Lantz, P.G., Al-Soud, W.A., Knutsson, R., Hahn-Hägerdal, B., Rådström, P., 2000. Biotechnical use of polymerase chain reaktion for microbiological analysis of biological samples. Elsevier Science B. V. Biotechnology Annual Review. 5, 87-130.
16. Lawson, G.H.K., McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. J. Clin. Microbiol. 31, 1136-1142.
17. Lawson, G.H.K., Gebhart, C. J., 2000. Proliferative Enteropathy. J. Comp. Pathol. 122, 77-100.
18. McOrist, S., Gebhart, C.J., 1999. Diseases of swine. 8th ed: Porcine proliferative enteropathies. Blackwell Science Ltd. Ames, Iowa, USA. 521-534.
19. Möller, K., Jensen, T.K., Jorsal, S.E., Leser, T.E., Carstensen, B., 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. Vet. Microbiol. 62, 59-72.
20. Nascimento Chiriboga, A.E.C., Guimarães, W.V., Vanetti, M.C.D., Araújo, E.F., 1999. Detection of *Lawsonia intracellularis* in faeces of swine from the main producing regions in Brazil. Can. J. Microbiol. 45, 230-234.
21. Ohlinger, V.F., Pesch, S., Knittel, J., 2000. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* samples from Germany, Netherlands and Belgium. Proc. 16th Int. Pig Vet. Soc: Congr. Melbourne, Australia, p.71.
22. Rowland, A.C., Lawson, G.H.K., 1992. Diseases of swine. 7th ed: Porcine proliferative enteropathies. Blackwell Science Ltd. Ames, Iowa, USA. 560-568.
23. Sapico, F.L., Reeves, D., Wexler, H.M., Duncan, J., Wilson, K.H., Finegold, S.M., 1994. Preliminary study using species-specific oligonucleotide probe for rRNA of *Bilophila Wadsworthia*. J. Clin. Microbiol. 32, 2510-2513.

24. Schwartz, K., Knittel, J., Walter, D., Roof, M., Anderson, M., 1999. Effect of oral tiamulin on the development of porcine proliferative enteropathy in pure-culture challenge model. *Swine Health Prod.* 7:1, 5-11.
25. Ward, G.E., Winkelman, N.L., 1990. Recognizing the tree forms of proliferative enteritis in swine. *Vet. Med.* 85:2, 197-203.
26. Ward, G.E., Winkelman, N.L., 1990. Diagnosing, treating, and controlling proliferative enteritis in swine. *Vet. Med.* 85:3, 312-318.
27. Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Env. Microbiol.* 63, 3741-3751.